

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing:

01 March 2001 (01.03.01)

International application No.:

PCT/JP00/05686

Applicant's or agent's file reference:

PH-1014-PCT

International filing date:

24 August 2000 (24.08.00)

Priority date:

24 August 1999 (24.08.99)

Applicant:

INOUE, Keizo et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

24 August 2000 (24.08.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

BEST AVAILABLE COPY

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

127
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-1014-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05686	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/027, C12N 15/12, 5/06, 5/16, A61K 45/00, A61P 3/02, 9/10, 3/10, G01N 33/50, 33/15		
Applicant INOUE, Keizo		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 24 August 2000 (24.08.00)	Date of completion of this report 03 April 2001 (03.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/IP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 13

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ the claims, or said claims Nos. 13 are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 13

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

T/JP 00/05686

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1 to 12

Document 1: The Journal of Biological Chemistry, Vol. 268, No. 24, pp. 17705-17710 (1993) (cited in the international search report)

Document 2: Biochemistry Journal, Vol. 306, No. 2, pp. 437-443 (1995) (cited in the international search report)

Document 3: Nature Genetics, Vol. 9, No. 2, pp. 141-145 (1995) (cited in the international search report)

Document 4: Nature, Vol. 336, pp. 348-352 (1988) (cited in the international search report)

Documents 1 to 3 disclose a relationship between the α -tocopherol transport protein gene and vitamin E deficiency. In addition, Document 4 discloses a method for producing knockout animals, a technique known in the art.

Therefore, a person skilled in the art could easily conceive of Claims 1 to 12 in the light of Documents 1 to 4.

Claims 1, 3-6, and 8-12

Document 5: Circulation, Vol. 100, No. 18, Supp. [S], pp.

231-231, 2 November 1999 (cited in the
international search report)

Document 5 discloses an α -TTP gene knockout mouse
produced by introducing a LacZ gene into the α -TTP gene.

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REJD 20 APR 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-1014-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05686	国際出願日 (日.月.年) 24.08.00	優先日 (日.月.年) 24.08.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. A01K67/027, C12N15/12, C12N5/06, C12N5/16, A61K45/00, A61P3/02, A61P9/10, A61P3/10, G01N33/50, G01N33/15		
出願人 (氏名又は名称) 井上 圭三		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 24.08.00	国際予備審査報告を作成した日 03.04.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 坂田 誠 電話番号 03-3581-1101 内線 3237	2B 2914

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

1. 次に、次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- ☒ 請求の範囲 13

☐ この国際出願又は請求の範囲 _____ は、国際予備審査をすることを要しない
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

- ☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- ☒ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 13 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 13 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

- ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-12

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-12

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-12

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-12について:

文献1: The Journal of Biological Chemistry, Vol. 268, No. 24, 17705-17710, (1993) (国際調査報告で提示した文献)

文献2: Biochemistry Journal, Vol. 306, No. 2, 437-443, (1995)
(国際調査報告で提示した文献)文献3: Nature Genetics, Vol. 9, No. 2, 141-145, (1995)
(国際調査報告で提示した文献)

文献4: Nature, Vol. 336, 348-352, (1988) (国際調査報告で提示した文献)

上記文献1乃至3には、 α -トコフェロール輸送タンパク質遺伝子の機能及び、ビタミンE欠乏症との関連性について記載されている。また、文献4には、周知技術であるノックアウト動物の作製方法が記載されている。

よって、請求の範囲1乃至12は、引用文献1乃至4から当業者が容易に想到し得るものである。

請求の範囲1, 3-6, 8-12について

文献5: Circulation, Vol. 100, No. 18, Supp[S], 231-231, (02.11.99)
(国際調査報告で提示した文献)文献5には、 α -TTP遺伝子にLacZ遺伝子を挿入して作製した α -TTP遺伝子ノックアウトマウスが記載されている。

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 PH- の書類記号 1014-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05686	国際出願日 (日.月.年) 24.08.00	優先日 (日.月.年) 24.08.99
出願人(氏名又は名称) 井上 圭三		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 13 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
スクリーニング方法のみで特定された薬剤であるので、具体的にどのような物質であるのか十分に開示されておらず、明細書による十分な裏付けを欠いている。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A01K67/027, C12N15/12, C12N5/06, C12N5/16,
A61K45/00, A61P3/02, A61P9/10, A61P3/10
G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A01K67/027, C12N15/12, C12N5/06, C12N5/16,
A61K45/00, A61P3/02, A61P9/10, A61P3/10
G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2000年
日本国登録実用新案公報 1994-2000年
日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DIALOG (BIOSIS)
JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol.268, No.24, 17705-17710, (1993)	1-12
Y	Biochemistry Journal, Vol.306, No.2, 437-443, (1995)	1-12
Y	Nature Genetics, Vol.9, No.2, 141-145, (1995)	1-12
Y	Nature, Vol.336, 348-352, (1988)	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.11.00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2B

2914

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	Circulation, Vol.100, No.18, Supp. [S], 231-231, (02.11.99)	1,3-6,8-12 2, 7

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/13716 A1

(51) 国際特許分類: A01K 67/027, C12N 15/12, 5/06, 5/16,
A61K 45/00, A61P 3/02, 9/10, 3/10, G01N 33/50, 33/15

Hiroshi) [JP/JP]; 〒411-0943 静岡県駿東郡長泉町下
土狩1150-22 Shizuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05686

(74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門
5森ビル3階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2000年8月24日 (24.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/237003 1999年8月24日 (24.08.1999) JP

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 井上圭三 (INOUE, Keizo) [JP/JP]; 〒135-0044
東京都江東区越中島1丁目3番 関東財務局越中島
住宅17-605号 Tokyo (JP). 新井洋由 (ARAI, Hiroyuki)
[JP/JP]; 〒112-0002 東京都文京区小石川5-35-8-604
Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 有田 誠
(ARITA, Makoto) [JP/JP]; 〒225-0011 神奈川県横浜市
青葉区あざみ野1-21-4-206 Kanagawa (JP). 寺社下浩一
(JISHAGE, Kou-ichi) [JP/JP]; 〒411-0041 静岡県三島
市佐野見晴台2-3-3 Shizuoka (JP). 鈴木宏志 (SUZUKI,

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: α -TOCOPHEROL TRANSPORT PROTEIN KNOCKOUT ANIMAL

(54) 発明の名称: α -トコフェロール輸送タンパク質遺伝子ノックアウト動物

(57) Abstract: A knockout animal wherein the expression of α -TTP gene is artificially inhibited. This animal is useful as a tool for clarifying the onset mechanism of diseases based on oxidation stress (inborn vitamin E deficiency, arteriosclerosis, diabetes, etc.) and developing remedies for these diseases.

(57) 要約:

α -TTP 遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物を提供する。この動物は、先天性ビタミンE欠乏症やその他動脈硬化や糖尿病などの酸化ストレスに基づく疾病の発症機構の解明、及びこれらの疾病の治療薬開発のためのツールとして有用である。

明細書

α -トコフェロール輸送タンパク質遺伝子ノックアウト動物

発明の属する技術分野

本発明は、 α -トコフェロール輸送タンパク質（以下、「 α -TTP」という）遺伝子の発現が抑制されている哺乳動物に関する。ヒト α -TTP 遺伝子は先天性ビタミンE 欠乏症の原因遺伝子であり、該哺乳動物は該疾患の治療法や治療薬開発のため、また酸化ストレスに基づく動脈硬化や糖尿病等の治療や治療薬開発のために利用されうる。

従来の技術

生体にとって酸素は必須のものであるが、同時に生体成分を不必要に酸化するという危険な側面も持っている。生体は、このようないわゆる酸化ストレスに対して、一連の防御機構を備えている。ビタミンE は、生体内における重要な抗酸化物質の一つである。生体成分の中で、生体膜リン脂質、特にリン脂質中の多価不飽和脂肪酸鎖は酸素に攻撃されやすい。生体膜が酸化的障害を受けると膜透過性が上昇し、細胞は死に至る。ビタミンE は脂溶性であり、通常、細胞内では生体膜二重層に埋まって存在し、生体膜の酸化防止において最も中心的な役割を担っている。

このビタミンE に特異的に結合するタンパクとして、 α -TTP はラットの肝臓の可溶性画分中から、膜間輸送を促進するタンパク質として見いだされ (Eur. J. Biochem. 177, 537, 1981)、タンパク質の精製そして遺伝子構造の解明もなされた (J. Biol. Chem. 268, 17705, 1993; Biochem. J. 306, 437, 1995)。さらにヒト α -TTP 遺伝子が、先天性ビタミンE 欠乏症 (Familial isolated vitamin E deficiency; FIVE deficiency) という遺伝疾患の原因遺伝子そのものであることが明らかにされた (Nature Genetics 9, 141, 1995)。

先天性ビタミンE 欠乏症とは、ビタミンE をいくら摂取しても、体内のビタミンE 濃度が上昇しない遺伝性の疾患として古くから知られていた。この患者は、神経、特に感覚神経の壊死をきたし、重篤な場合20歳前後で死亡する。ビタミン

ン E は血漿リポタンパク質に結合して血液中を循環し、抹しょう組織に運ばれる。一方、血漿リポタンパク質は、肝臓から分泌され、最終的には再び肝臓に取り込まれて代謝されるが、食餌中から血管を経て吸収されたビタミン E は肝臓にてリポタンパク質 (VLDL) 上に組み込まれる。本遺伝病では、まさにこの過程すなわち、肝臓での VLDL へのビタミン E の移行過程に障害がみられる。

発明が解決しようとする課題

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、 α -TTP の機能解析や α -TTP の変異に起因する疾患のための薬剤の開発に有用な非ヒト哺乳動物を提供することを課題とする。また、従来、ビタミン E 欠乏食を与えることで動物をビタミン E 欠乏状態にすることは可能であったが、正常動物では、効率の良いビタミン E の再循環系 (この系に α -TTP が関与する) の存在のためビタミン E の体内からの完全消失には非常に長期間を要した。このビタミン E の再循環系に関与する α -TTP 遺伝子を欠損させた動物を作製することにより、ビタミン E 欠乏、言い換えれば生体内の重要な抗酸化物質欠乏に基づく疾患の解明そしてそれに対する薬剤の開発に有効な、先天的ビタミン E 欠乏の酸素ストレス高感受性のモデル動物の作製を課題とする。より詳しくは、 α -TTP 遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物およびその作製方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

本発明者らは、人為的に α -TTP 遺伝子を欠損させた哺乳動物モデルの作製を試みた。具体的には、実施例に詳しく示されるように、マウス α -TTP 遺伝子 (cDNA、ゲノム DNA) のクローニングを行い、これを用いて相同組み換え用のベクターを構築し、これをマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) に導入して組み換えクローンを得て、それをマウス個体に戻すという手法により変異した α -TTP 遺伝子を持つマウスを得ることに成功した。本発明により得られた哺乳動物あるいはそれから樹立した細胞株は、 α -TTP 遺伝子の欠損に基づく各種疾患の発症メカニズム、そして酸素ストレスに関連すると考えられているほかの病態 (例えば、動脈硬化、糖尿病、虚血性疾患、パーキンソン病など) を解明するためのツールとして、さらにはこ

これらの疾患に対する治療法や治療薬の開発に対しても非常に有用なツールであると考えられ、様々な目的に応用されることが期待される。

本発明は、以下の(1)～(4)に関するものである。

(1) α -TTP をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト哺乳動物並びにそれから調製される非ヒト哺乳動物細胞

(2) α -TTP をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化可能である非ヒト哺乳動物細胞

(3) 上記(1)の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、(a) 上記(2)の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法

(4) 上記(1)の非ヒト哺乳動物、上記(1)及び(2)の非ヒト哺乳動物細胞を用いた医薬品のスクリーニング方法並びにそれによって得られる医薬品

発明の開示

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) ノックアウト動物及びそれから調製される細胞

本発明のノックアウト動物及びそれから調製される細胞は、 α -TTP をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とするものである。

遺伝子の発現を抑制する手段としては、 α -TTP 遺伝子またはその発現制御領域の一部を欠損させる手段を例示することができるが、これに限定されるわけではない。なお、本発明において「遺伝子の発現の抑制」には、完全な抑制および部分的な抑制が含まれる。また、特定の環境下での抑制も含まれる。更に、2つのアレルの一方の発現が抑制されている場合も含まれる。

動物の種類は、ヒトを除く哺乳動物であれば特に限定されないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどのげっ歯類に属する動物が好ましく、その中でもマウスが特に好ましい。

本発明のノックアウト動物は、例えば、後述する方法によって作製することができる。

本発明のノックアウト動物は、 α -TTP 遺伝子の機能不全に起因する疾患及び酸

化ストレスに基づく疾患に対する治療薬や治療方法の開発に有用である。例えば、本発明のノックアウト動物に被検化合物を投与し、動脈硬化症、糖尿病に対する影響を検査し、所望の効果を示す化合物を選択する。これにより、治療薬となり得る物質を取得することができる。

また、本発明のノックアウト動物から調製された細胞を用いて、前述した疾患の治療薬や治療方法の開発も考えられる。例えば、本発明のノックアウト動物の胚などから細胞を調製し、被検化合物を添加し、細胞膜に対する酸化的障害などに対する影響を調べる。その結果、所望の効果を示す化合物を選択する。細胞は、初代培養細胞を用いることもできれば、株化した細胞を作製して用いることもできる。以上によりスクリーニングされた化合物は医薬品の候補となる。

(2) 動物細胞

本発明の動物細胞は、 α -TTP をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化可能であることを特徴とするものである。

遺伝子の発現を抑制する手段及びその意味、並びに対象とする動物の種類は、上記のノックアウト動物の場合と同様である。

本発明の動物細胞を作製する方法は特に限定されないが、 α -TTP 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により α -TTP 遺伝子の発現を抑制した細胞は、相同組換え（ノックアウト）用ベクターを構築し、該ベクターを適当な細胞内に導入することにより作製することができる。

該相同組換え用ベクターは、標的動物の内在性 α -TTP 遺伝子を失活させるために設計された核酸配列を含む。このような核酸配列は、例えば、 α -TTP 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠失させた核酸配列でもよく、また、 α -TTP 遺伝子またはその発現制御領域に他の遺伝子が挿入された核酸配列であってもよい。このように α -TTP 遺伝子またはその発現制御領域に挿入される他の遺伝子としては、マーカーとしても機能する遺伝子が好ましい。このような遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子（G418 耐性により選択）やチミジンキナーゼ遺伝子（ガンミクロビル耐性により選択）などの薬剤耐性遺伝子、ジフテリア毒素 (DT) A 遺伝子などの毒素遺伝子、またはこれらの組み合わせを用いることができる。これら遺伝子の α -TTP 遺伝子における挿入場所は、標的におけ

る内在性 α -TTP 遺伝子の発現を抑制しうる位置であれば特に限定されない。

クローニングした α -TTP 遺伝子へのこれらの遺伝子の挿入は、試験管内において、通常の DNA 組み換え技法を用いて行うことができる (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。

このようにして構築された相同組み換え用ベクターを、個体へ分化させることが可能な細胞 (例えば、ES 細胞) に導入し、該細胞中の α -TTP 遺伝子との相同組み換えを行う。

相同組み換え用ベクターの細胞への導入は、当業者によく知られた方法、例えば、エレクトロポレーション法を利用して行うことができる。この結果、一部の細胞内においては細胞中の α -TTP 遺伝子と相同組み換え用ベクターの対応する領域との間で組み換えが生じ、相同組み換え用ベクター中に構築されていた遺伝子と野生型の遺伝子とが置き換わることとなる。このようにしてマーカー遺伝子が挿入された α -TTP 遺伝子を持つ細胞を得ることができる。

相同組換えベクターにおいてマーカー遺伝子を利用している場合には、所望の相同組換えが行なわれた細胞は、 α -TTP 遺伝子が失活し、同時にマーカー遺伝子を得ることとなるので、このマーカー遺伝子を指標とすることにより選抜を行なうことができる。例えば、マーカー遺伝子として、薬剤耐性遺伝子を用いた場合には、ベクター導入後の細胞を、致死濃度の薬剤の存在下で培養することにより、所望の相同組換えが行なわれた細胞を選抜することができる。

本発明の動物細胞は、上述のノックアウト動物を作製するために利用することができる。また、本発明のノックアウト動物から調製される細胞と同様に医薬品のスクリーニングにも利用することができる。

(3) 非ヒト哺乳動物の作製方法

本発明の非ヒト哺乳動物の作製方法は、(a) 上述の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入し、キメラ胚を作製する工程、及び (b) 該キメラ胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程を含むものである。

(a) キメラ胚を作製する工程

胚に注入する細胞として、ES 細胞を用いた場合には、これを胚盤胞に注入することによりキメラ胚を作製することができる。注入に用いる胚盤胞は妊娠した雌

の子宮を灌流することによって得ることができる。

(b) キメラ胚の移植工程

キメラ胚を偽妊娠させた哺乳動物の子宮角に移植することによりキメラ動物を得ることができる。胚に注入した細胞（ES 細胞）が発生分化中の胚に取り込まれたか否かを個体作製後に検定できるようにするために、作製された個体の外部的特徴（例えば、毛色）が、注入した細胞に由来する部分と胚盤胞に由来する部分とで異なるように、胚盤胞を選択することが好ましい。

以上の二つの工程の後、キメラ動物を適当な系統の同種動物と交配させることにより産仔を得る。キメラ動物の生殖細胞が注入した細胞に由来すれば α -TTP 遺伝子の発現が抑制された産仔を得ることができる。

(4) 医薬品のスクリーニング方法及びそれによって得られる医薬品

本発明の医薬品のスクリーニング方法は、上記の非ヒト哺乳動物又は上記の非ヒト哺乳動物細胞を用いることを特徴とするものである。

本発明の非ヒト哺乳動物等は、 α -TTP 遺伝子の機能不全に起因する疾患（例えば、先天性ビタミン E 欠乏症）及び酸化ストレスに基づく疾患（例えば、動脈硬化、糖尿病、虚血性疾患、パーキンソン病など）のモデルとなり得るので、これらの疾患の治療及び予防薬のスクリーニングに使用することができる。

実施例

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] α -TTP 遺伝子の相同組み換え用ベクターの作製

本実施例では、マウス α -TTP 遺伝子の相同組み換え用ベクターを構築するために、まずマウス α -TTP ゲノム遺伝子のクローニングを行った。このゲノム DNA を用い、Mansour らの報告 (Nautre 336, 348, 1988) に従ってポジティブ/ネガティブセレクションを行うために、ネオマイシン耐性遺伝子およびチミジンキナーゼ遺伝子を挿入した相同組み換え用ベクターを構築した。この際、ネオマイシン耐性遺伝子は、エクソン 1 と置き換わるように挿入し、正常な α -TTP が作製できないようにした。以下具体的に説明する。

A. マウス α -TTP 遺伝子のクローニング

SUPERSCRIPT Lambda System (GIBCO BRL) を用いて、マウス (C57BL/6) 肝臓の cDNA ライブラリー (Lambda gt22A) を作製し、ラット TTP cDNA の全オープンリーディングフレームをプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った。その結果 2 つの陽性クローンが得られたが、いずれも翻訳開始点まで届いていなかった。そこでマウス肝臓より調製した totalRNA に対して MATTP-00 (AGGAATTCATGGCAGAGATGCG, 配列番号 8) 及び MATTP-04 (AGGGCGTAGATCTGCACTTAAT, 配列番号 9) をプライマーにして RT-PCR を行った。MATTP-00 の配列は同時進行していたマウス TTP genomic DNA の配列より得た。シーケンシングの結果、マウス TTP cDNA の全オープンリーディングフレーム配列を決定した。こうして得られたマウス TTP cDNA の配列を配列番号 1 に、またそのアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

マウス α -TTP ゲノム DNA は以下のようにしてクローニングした。

ラット TTP cDNA の全オープンリーディングフレームをプローブとしてブランクハイブリダイゼーション法によりマウス (129/SVJ) genomic DNA Lambda FIX II ライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローン (BS-MG6) から調製したファージ DNA を制限酵素 EcoRI で切断し、ラット TTP の 5' 側 260bp をプローブにしてサザンブロッティングを行い、翻訳開始点を含むエクソンを含む断片を検出し、pBluescriptII にサブクローニングした (TTP-MG6)。

TTP-MG6 の 2749bp の塩基配列のシーケンスを行い、エクソン 1 が TTP-MG6 に含まれていることを確認した (配列番号 3)。

クローン BS-MG6 を主要な制限酵素 (EcoRI, SmaI, KpnI, Apal, EcoRV, Sall, HindIII) で切断し、その制限酵素サイトの位置の地図を作製した (図 1)。

B. 相同組み換え用ベクターの構築

クローン BS-MG6 ファージ DNA に含まれるマウス α -TTP 遺伝子を、EcoRI サイトによって分割される 2 つの断片 (断片 1, 2, 図 1) に分けてそれぞれプラスミドベクターにサブクローニングを行った。すなわち、まず BS-MG6 ファージ DNA を EcoRI で切断し、生じた約 3.75kbp の断片 (断片 1) と約 5.5kbp の断片 (断片 2) をあらかじめ smaI サイトを Sall リンカー (Takara) を導入することにより Sall

サイトに変更してある pBluescriptII (Toyobo) の EcoRI サイトに組み込み、クローン pSKot-2 と pSKot-3 を得た。

これらのサブクローンから以下のようにして相同組み換え用のベクターを構築した。まず、クローン pSKot-2 を EcoRI/EcoRV で切断し、この切断末端を Takara DNA Blanting Kit (Takara) を用いた方法により平滑末端化した (pSKot-2-1)。次いで pSKot-2-1 を SmaI で切断し、HindIII リンカーを挿入した (pSKot-2-2)。pSKot-2-2 の HindIII サイトに polyA 添加シグナルを持たないネオマイシン耐性遺伝子を組み込みエクソン 1 をネオマイシン耐性遺伝子に置き換えた (pSKot-2-2Neo)。次いで pSKot-3 に含まれるエクソン 2 の SmaI サイトに BamHI Stop Codon リンカー (日本ジーン) を導入した (pSKot-3stop codon)。pSKot-2-2Neo を EcoRI で切断し、pSKot-3stop codon から EcoRI で切断し切り出された断片を組み込んだ (pSKot-2+3Neo)。pSKot-2+3Neo を XhoI で切断し、チミジンキナーゼ遺伝子を組み込み、相同組み換え用ベクター (α -TTP Targeting Vector) を得た。

このベクターは以下のような特徴を持つ (図 2)。

- (i) 第 1 エクソンに置き換わる形でネオマイシン耐性遺伝子が、そして第 2 エクソン中に終止コドン配列が挿入されている。
- (ii) ネガティブ選択用マーカー遺伝子としてチミジンキナーゼ遺伝子を持つ。
- (iii) 野生型 α -TTP 遺伝子との相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子上流が約 0.8kb、ネオマイシン耐性遺伝子下流が約 8kb である。

〔実施例 2〕 相同組み換えによる変異 α -TTP 遺伝子を持つ ES 細胞の樹立

本実施例では、相同組み換え用ベクターを、エレクトロポレーション法によりマウス ES 細胞 AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON 社 The Mouse Kit) に導入し、次いで G418 により選択培養を行った。得られた G418 耐性コロニーについて、PCR およびサザンブロットにより相同組み換え体の検定を行った。以下、具体的に説明する。

相同組み換え用ベクター (α -TTP Targeting Vector) DNA 30 μ g を NotI で切断することにより線状化し、精製した。この DNA をマウス ES 細胞 AB2.2-Prime ES

Cells (LEXICON 社 The Mouse Kit) 3×10^7 個を含むエレクトロポレーション用緩衝液 (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQPBS) に懸濁し、Field Strength 575V/cm、Capacitance $500 \mu\text{F}$ の条件で、遺伝子導入を行った。導入後 24 時間から終濃度 $300 \mu\text{g/ml}$ の G418 (Genetisin, Sigma) で選択培養を行った。

ES 細胞の培養には、ESQDMEM (LEXICON 社 The Mouse Kit) 培養液に終濃度 15% の牛胎児血清 (ESQFBS, LEXICON 社 The Mouse Kit)、終濃度 2mM の L-グルタミン (ESQGPS, LEXICON 社 The Mouse Kit)、終濃度 $100 \mu\text{M}$ β -メルカプトエタノール (ESQBME, LEXICON 社 The Mouse Kit)、そして終濃度 50U/ml のペニシリンと終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを添加した ES 細胞用培地を用いた (以下 ES Cell Medium)。

また、ES 細胞用のフィーダー細胞としては ESQ Feeder cells (LEXICON 社 The Mouse Kit) を用い、培養液は ESQ DMEM に終濃度 7% の FBS を添加したものをを用いた。ESQ Feeder cells (5×10^7 細胞/バイアル) を、 37°C で急速融解後、フィーダー用培地で細胞数 4.4×10^5 cells/ml に調整し、あらかじめゼラチンコート (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQ Gelatin) した培養器に、100mm ϕ ディッシュの場合は 12ml、60mm ϕ ディッシュの場合は 4ml、6 穴プレートの場合は 2ml/穴、24 穴プレートの場合は 0.5ml/穴、そして 96 穴プレートの場合は $75 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注した。以上のように作製したフィーダー細胞は 3 週間以内に使用した。

遺伝子導入後 11 日目から、以下のようにして、出現した G418 耐性コロニーを 96 穴のマイクロプレートに継代した。すなわち、マイクロピペットを用いて G418 耐性コロニーを $30 \mu\text{l}$ の ESQ trypsin (LEXICON 社 The Mouse Kit) 溶液を含む 96 穴のマイクロプレート (Corning 25860MP) に移し換え、数分間処理した後、 $70 \mu\text{l}$ の ES 細胞培養用培地を加え、ピペッティングすることによって単一細胞にした。この細胞懸濁液を 96 穴のマイクロプレート (Falcon 3072) に移し換え培養を継続した。3 日後、96 穴のマイクロプレート上の細胞がコンフルエントに達した段階で、以下のようにして細胞を 2 つに分割した。すなわち、細胞に TE を $25 \mu\text{l}$ 加え分散させ、ES 細胞用培地を $25 \mu\text{l}$ 加えピペッティングすることによって単一細胞にした後、 $2 \times$ Freezing medium (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQ DMEM:ESQ FBS:DMSO=2:2:1) を $50 \mu\text{l}$ 加え、その $20 \mu\text{l}$ を ES 細胞用培地 $150 \mu\text{l}$ の入ったゼ

ラチンコートした 96 穴マイクロプレート (Iwaki 4860-020) に継代し、PCR による相同組み換え体検定用の DNA を抽出するために培養した。残りの ES 細胞には、流動パラフィン 100 μ l (0.2 μ m のフィルターで濾過滅菌したもの) を加え、-80℃ で凍結保存した。尚、DNA 抽出用の ES 細胞の培養にはフィーダー細胞は用いず、その他の ES 細胞の培養には全てフィーダー細胞を用いて行った。相同組み換え体の検定は、PCR によって以下の通りに行った。すなわち、コンフルエントの状態まで細胞が増殖した 96 穴プレートの各ウェルから培地を取り除き、Lysis buffer (10x Taq buffer 5 μ l、5% NP-40 5 μ l、Proteinase K 4 μ l、H₂O 36 μ l) を加え、55℃ で 2 時間加温した。溶解したサンプルを 0.5ml チューブに回収し、95℃ で 15 分間処理した後 10,000rpm で 10~15 分間遠心し、その上清 1 μ l を PCR 用の鋳型 DNA として用いた。

PCR のプライマーは、相同組み換え用ベクター上のネオマイシン耐性遺伝子の PGK プロモーターと、相同組み換え用ベクターに含まれないエキソン 1 上流との間、約 0.9kb が増幅されるように設計した (図 2)。

すなわち、PGK プロモーター上の配列を含む PGK-1 プライマー (5' GCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTG 3' : 配列番号 : 5) 及び第 1 エキソン上流に位置する ot-198 プライマー (5' AGCCCCACACAAAAATGAAAAACGTCTCCAAG 3' : 配列番号 : 6) を用いて、以下の条件で PCR を行った。

反応液組成

10 x ExTaq バッファー (TaKaRa) 5 μ l

2.5mM dNTPs 4 μ l

ExTaq (TaKaRa) 0.5 μ l

10 μ M ot-198 プライマー 1 μ l

10 μ M PGK-1 プライマー 1 μ l

サンプル 1 μ l

H₂O 37.5 μ l

反応条件

95℃、1 分 → (94℃、30 秒 → 62℃、1 分 → 72℃、1 分 20 秒) x 35 サイクル →

72℃、7分

PCRの結果から相同組み換え体であると考えられたクローンは、調べた G418 耐性クローン 316 個中 5 個（クローン L44、クローン L228、クローン L236、クローン L253、クローン L 254）であった。

PCR 解析で相同組み換えが確認されたクローンは、凍結保存してあった 96 穴プレートを 37℃に温めることにより融解し、24 穴プレートに継代した。この 24 穴プレートを 24 時間、37℃で培養後、DMSO と流動パラフィンを除くために培地を交換した。それぞれのクローンが 75~90%コンフルエントに達した時点で 24 穴から 6 穴プレートに継代した。さらに、6 穴プレートに 75~90%コンフルエントまで増殖したものが 2 穴分得られたところで、1 穴分は凍結保存し、残りの 1 穴分は胚盤胞への注入及び DNA 抽出に使用した。

凍結保存は以下の如く行った。すなわち、細胞を ESQ PBS で 2 回リンスした後、0.5ml の ESQ Trypsin (LEXICON 社 The Mouse Kit) を加え、37℃で 15~20 分間保温しトリプシン処理を行った後、さらに 0.5ml の ES Cell medium を加え、35~40 回ピペティングを行い ES 細胞の塊を完全に解離させた。この細胞懸濁液を 15ml 遠心チューブに移し、さらに 1ml の ES Cell Medium でウェルを洗ってチューブに回収した。チューブを 1,000rpm で 7 分間遠心し、培地を取り除き 0.25ml ES Cell Medium に再懸濁し、0.25ml の 2 x Freezing medium を加えた。クライオジェニックバイアルにウェルの中身に移し、-80℃で凍らせ、液体窒素中で保存した。

胚盤胞への注入及び DNA 抽出用の細胞は、ES 細胞の塊を完全に解離させた後、その四分の一を胚盤胞への注入に用い、残りの細胞の三分の一、及び三分の二をそれぞれゼラチンコートした 60mm ディッシュに継代した。前者は細胞がコンフルエントにまで増殖したところでサザンブロット解析用のゲノム DNA を抽出し、後者の細胞はコンフルエントにまで増殖したところで 3 本に分けて凍結した。

〔実施例 3〕 組み換え α -TTP 遺伝子を持つ ES 細胞によるキメラマウスの作製

相同組み換えが確認された ES 細胞クローンについて、C57BL/6J 系マウスの胚盤胞を宿主胚としてキメラ胚を作製し、それを偽妊娠マウスの子宮角に移植し

て産仔を得た。宿主胚の採取は、妊娠 2 日目に、100 μ M EDTA を添加した Whitten's 培地で、卵管と子宮を灌流することによって行った。8 細胞期胚または桑実胚を 24 時間 Whitten's 培地で培養し、得られた胚盤胞を注入に用いた。注入に用いた ES 細胞は、継代してから 2 あるいは 3 日目に TE 処理により分散させ、顕微操作に供するまで 4℃ で静置した。

ES 細胞の注入用ピペットとしては、Cook IVF 社製の polar body extrusion pipette (内径約 20 μ m) を用いた。胚保定用ピペットとしては、外径 1mm の微小ガラス管 (NARISHIGE) を微小電極作製器 (Sutter 社 P-98/IVF) を用いて細く引き延ばした後、マイクロフォーシ (De Fonburun) を用いて外径 50~100 μ m の部分で切断し、さらに口径を 10~20 μ m に加工したものをを用いた。

注入用ピペットと保定用ピペットは、先端から約 5mm の部分を約 30 度曲げて、マイクロマニピュレーター (LEITZ) に接続した。顕微操作に用いたチャンバーとしては、穴あきスライドガラスにカバーガラスを蜜蝋で接着したものをを用い、その上に約 20 μ l の 0.3% BSA を加えた HEPES-buffered Whitten's 培地のドロップを 2 個置き、上面を流動パラフィン (ナカライテスク 261-37 SP) で覆った。一方のドロップには、約 100 個の ES 細胞を入れ、他方には拡張胚盤胞を 10~15 個入れ、胚 1 個あたり 10~15 個の ES 細胞を注入した。

顕微操作はすべて、倒立顕微鏡下で行った。操作胚は、1~2 時間の培養後、偽妊娠 2 日目の ICR 系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に保育させた。

C57BL/6J 系マウスの胚盤胞 40 個に、クローン L236 ES 細胞を注入した結果、40 個の胚盤胞への注入が成功した (成功率 100%)。この 40 個を偽妊娠 2 日目の ICR 系受容雌の子宮角に移植した結果、5 匹の産仔が得られた。相同組み換え体由来する部分の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J 系マウスに由来する部分の毛色はブラック色を呈する。得られた 5 匹の産仔のうち、全例が毛色からキメラマウスと判定でき、形態的に雄を示していた。これらのキメラマウスにおける毛色から判断した ES 細胞の寄与率は 10~90% の幅であった。同様に、クローン L253 ES 細胞からもキメラマウスが得られた。これらのキメラマウス作出に関する成績を表 1 に示した。

表1キメラマウス作出成績表

クローンNo.	注入胚数 / 操作胚数 (%)				移植胚数			産仔数				毛色キメラ数				ES細胞の毛色への寄与率
								Total	(%)	♂	♀	Total	(%)	♂	♀	
L228	22	/	25	88%	22	21	95%	10	45%	6	4	4	40%	2	2	♂(70,70) ♀(80,5)
L236	40	/	40	100%	40	24	60%	14	35%	11	3	5	36%	5	0	♂(90,90,90,70,10)
L253	75	/	77	97%	75	65	87%	11	15%	7	4	8	73%	5	3	♂(95,80,70,50,30) ♀(60,50,10)
L44	64	/	72	89%	64	42	66%	16	25%	16	0	11	69%	11	0	♂(90,90,90,80,80,70,50,40,30,20,5%)

〔実施例4〕 相同組み換え体の生殖系列への伝達の検定

実施例3のキメラマウスをC57BL/6J系マウスと交配させ、ES細胞由来の産仔が得られるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞がES細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は、野性色を呈し、C57BL/6J系マウスの胚盤胞に由来していればブラック色を呈することとなる。

クローンL236 ES細胞については、性成熟に達する前に死亡した1例を除いた2例(No. L236-1~2)の雄キメラマウス全例において、ES細胞の生殖系列への伝達を確認された。野性色を示した産仔数/得られた産仔数は、それぞれ、32/44と19/44であった。またクローンL254 ES細胞についても、6例(No. L254-1~6)のキメラマウスのうち4例(No. L254-1、2、4、5)においてES細胞の生殖系列への伝達を確認された。野性色を示した産仔数/得られた産仔数は、それぞれ、4/15、2/12、2/14と4/9であった。

次に、これらの野性色マウスの尾の一部からDNAを抽出し、PCRにより、変異 α -TTPアリルが伝達されているかを調べた。その結果、クローンL236 ES細胞由来の産仔、そしてクローンL254 ES細胞由来の産仔においても変異 α -TTPアリルが伝達されていることが確認された。

片側のアリルの α -TTP遺伝子に変異を持つヘテロ欠損マウス同士の交配により、両側のアリルに変異を持つホモ欠損マウスの作製を行った。野生型、ヘテロ欠損そしてホモ欠損マウスの各遺伝子型の解析には、PCRによって行った。すなわち、変異アリルの存在を前述のot-198とPGK-1のプライマーの組み合わせでPCRを行い、野生型アリルの存在をot-198プライマーとエクソン1の配列を含むTTP N17プライマー(5' TCTCTGCAATGCCCGCCGTGCTGTCCCG 3') (配列番号7)との組み合わせでPCRを行った。尚、ot-198とTTP N17プライマーとの組み合わせで行う

PCR の反応は、前述の ot-198 と PGK-1 のプライマーの組み合わせで PCR を行う条件と同様である。この 2 つのプライマーの組み合わせを用い PCR を行い、その増幅産物について電気泳動を行った。この結果を図 3 に示す。電気泳動の結果から、野生型アリの存在が検出でき、変異アリの存在が検出できないものを野生型マウス（図中では W1 と示した。）、その反対に野生型アリの存在が検出できず、変異アリの存在が検出できたものをホモ欠損マウス（図中では H0 と示した。）、そして野生型と変異アリ両方が検出されたものをヘテロ欠損マウス（図中では HE と示した。）と判定した。

また、遺伝子型の解析はサザンハイブリダイゼーションによっても行った。マウスのゲノム DNA を EcoRI で切断した後、0.7% アガロースゲルで電気泳動を行った。各レーンには、15 μ g のゲノム DNA を泳動させた。ゲル中の DNA を Hybond N+ ナイロンフィルター（Amersham）に転写し、サザンハイブリダイゼーションを行った。プローブは、エクソン 1 周辺の SmaI-SmaI-SmaI サイト間の配列（図 1 及び図 2 参照）を用いた。電気泳動の結果を図 4-1 に、サザンハイブリダイゼーションの結果を図 4-2 に示す。図 4-2 に示すように、レーン 2、3、9、12、16、17 では、矢印の位置（3.75kbp）にシグナルは検出されなかった。これは、レーン 2、3、9、12、16、17 に対応するマウスは、エクソン 1 周辺の配列が欠損していることを示す。

以上の遺伝子型の解析の結果、野生型：ヘテロ欠損：ホモ欠損マウスの比率は、63 匹：105 匹：74 匹（計 242 例）であり、ほぼメンデルの法則通り 1：2：1 の割合になっていた。メンデルの法則どおりの理論値では、242 例では 60.5 匹：121 匹：60.5 匹になる。

〔実施例 5〕 α -TTP 欠損マウスの α -TTP の発現解析

α -TTP ホモ欠損マウス 6 例、ヘテロ欠損マウス 5 例そして野生型マウス 4 例の各個体の肝臓より、total RNA とタンパク質を採取し、それぞれノーザンブロット法とウエスタンブロット法で α -TTP の mRNA とタンパク質の発現を確認した。

ノーザンブロットは、10 μ g の total RNA に対し、マウス α -TTP の cDNA の ORF 全長をプローブとして用いて行った。ノーザンブロットの結果を図 5-1 に示す。また、 α -TTP 遺伝子の mRNA の発現量をバイオイメージアナライザー（BAS5000、

Fuji Film) の PSL 値から求め、野生型、ヘテロ、ホモの三者間で比較した。この結果を図 5-2 に示す。この図に示すように、mRNA の発現量は、野生型：ヘテロ：ホモで 2 : 1 : 0 の比率であった。

ウエスタンブロットは、抗 rat α -TTP ポリクローナル抗体を用い、二次抗体として alkaline phosphate-conjugated anti rabbit IgG を用いて行った。発色は、AP conjugate substrate kit (Bio-Rad) を使用した。ウエスタンブロットの結果を図 6 に示す。この図に示すように、タンパク質の発現量は、野生型：ヘテロ：ホモで 2 : 1 : 0 の比率であった。

α -TTP ホモ欠損マウス、ヘテロ欠損マウスそして野生型マウスに、4 週齢の時点より、 $82 \mu\text{mol/kg}$ の濃度の α トコフェロールを給餌し、それぞれの血漿中の α トコフェロール濃度を測定した。 α トコフェロール濃度の測定は、Kim, H. S. et al. の方法に従って行った (Free Rad. Res. 28, 87-92, 1998)。すなわち、ヘパリン採血したマウス血漿 $50 \mu\text{l}$ に $950 \mu\text{l}$ の PBS を加え、 1ml の 6% pyrogallol in EtOH を加え、混合し、 70°C で 2 分間放置した後に 60% KOH を 0.2ml 加え、 70°C で 30 分間けん化し、 5ml n-hexane, 2.5ml H_2O を加え、ボルテックスした後に遠心、n-hexane 層を 4ml 回収した。そして、エバポレーション後、 100ml エタノールに溶かし、HPLC で解析した。HPLC の条件は、カラム：IRIKA RP18 (250X4mm)、移動相： $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NaClO}_4$ (1000/2/7, v/v/w、検出：IRIKA Amperometric E-520 detector) で行った。なお、内部標準物質として tocol を用いた。各マウスの α -トコフェロール濃度の経時的変化を図 7 に示す。図 7 に示すように、ホモ欠損マウスの血漿中 α トコフェロール濃度は、検出限界以下であった。またヘテロ欠損マウスの血中 α トコフェロール濃度は、野生型のそれと比較し約 $1/2$ の濃度であった。このことから α -TTP の発現量が血中 α トコフェロール濃度を規定する因子であることが示された。

[実施例 6] 胎児吸収—妊娠試験 (Resorption-Gestation Test)

ビタミン E が、抗不妊作用物質として発見された経緯から、ビタミン E 欠乏症に対する生物学的試験法として、胎児吸収—妊娠試験法が広く利用されている (Biol. Syposia 12, 459, 1947)。すなわち、ビタミン E 欠乏食を与えた動物を妊娠させた場合に、胎仔の発生が止まり、その後胎仔が吸収されてしまう現象を

利用した試験法である。この試験法を、 α -TTP ホモ欠損マウスにおいて行い、ビタミンE 欠乏症の状態を生物学的に確認した。その結果、 α -TTP ホモ欠損マウスは、妊娠するものの、胎仔の発生は妊娠中期に止まり、吸収されていることが確認された（表2）。

表2 α -TTPノックアウトマウスの胎仔吸収一妊娠試験

雌マウスの 遺伝子型	個体番号	×	雄マウスの 遺伝子型	個体番号	着床胚数	退行・吸収 胎仔数	(%)*	生存胎仔 数	(%)*
ホモ	42	×	ホモ	15	16	16	100	0	0
	44	×		17	16	16	100	0	0
	46	×		31	7	7	100	0	0
	27	×		4	0	—	—	—	—
	6	×		3	0	—	—	—	—
	計				39	39	100	0	0
	5	×	野生型	C57BL/6J	8	8	100	0	0
	8	×		C57BL/6J	11	11	100	0	0
	17	×		C57BL/6J	10	10	100	0	0
	13	×		C57BL/6J	6	6	100	0	0
	計				35	35	100	0	0
野生型	C57BL/6J	×	ホモ	10	4	1	25	3	75
	C57BL/6J	×		2	9	2	22	7	78
	C57BL/6J	×		12	9	0	0	9	100
	C57BL/6J	×		15	9	9	100	0	0
	ICR	×		15	15	0	0	15	100
	ICR	×		15	16	2	13	14	87
	C57BL/6J	×		31	10	10	100	0	0
	ICR	×		31	16	1	6	15	94
	計				88	25	28	63	72

*着床数に対する%を示す

また野生型の2細胞期卵を偽妊娠状態のホモ欠損マウスの卵管に移植した場合においても、胎仔の発生が止まり、吸収されていることが確認された（表3）。

表3 野生型の卵を α -TTPノックアウトホモ雌に移植した場合の胎仔吸収一妊娠試験成績

ホモ雌の 個体番号	移植した卵子 の遺伝子型	移植時の 卵子の発 生段階	移植卵子 数	着床数	(%)*	退行・吸 収胚数	(%)*	生存胎仔 数(移植後 18日目)	(%)*
11	野生型(ICR)	前核期	12	0	0	—	—	—	—
14	野生型(ICR)	前核期	12	1	8%	1	100%	0	0%
7	野生型(ICR)	2細胞期	12	11	92%	11	100%	0	0%
15	野生型(ICR)	2細胞期	12	10	83%	10	100%	0	0%
計			48	22	46%	22	100%	0	0%

*: 移植卵子数に対する%

**: 着床数に対する%

このことから妊娠雌のビタミン E 量が、胎仔の遺伝型に関係なく胎仔の発生に関与していることが証明された。この結果から、 α -TTP ホモ欠損マウスにおけるビタミン E 欠乏状態が生物学的試験法において示された。

発明の効果

本発明により、 α -TTP 遺伝子の発現が人為的に抑制された哺乳動物が提供される。本発明の哺乳動物は、先天性ビタミン E 欠乏症などの α -TTP 遺伝子の欠損に基づく疾病の発症、さらに酸素ストレスに関連すると考えられている病態機構の解明、及び治療薬、治療法等の開発のためのツールとして非常に有用である。

図面の簡単な説明

図 1 : BS-MG6 の制限酵素サイトを示す図である。

図 2 : 相同組換え用ベクターの構造を示す図である。

図 3 : 野生型 α - TTP 遺伝子及び変異型 α - TTP のそれぞれに特異的なプライマーを用いた PCR の結果を示す図である。

図 4 : マウスゲノム DNA 断片の電気泳動の結果を示す図 (図 4 - 1)、エクソン 1 周辺の配列を有するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図 (図 4 - 2) である。

図 5 : マウス α - TTPcDNA をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す図 (図 5 - 1)、ノーザンハイブリダイゼーションのシグナル強度を示す図 (図 5 - 2) である。

図 6 : 抗 rat α - TTP ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

図 7 : マウス血中トコフェロール値の経時的変化を示す図である。

請求の範囲

1. α -トコフェロール輸送タンパク質をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物。
2. α -トコフェロール輸送タンパク質をコードする内在性遺伝子の発現の抑制が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損によるものであることを特徴とする請求項1に記載の非ヒト哺乳動物。
3. 非ヒト哺乳動物が、げっ歯類に属する動物であることを特徴とする請求項1又は2に記載の非ヒト哺乳動物。
4. げっ歯類に属する動物が、マウスであることを特徴とする請求項3に記載の非ヒト哺乳動物。
5. 請求項1から4のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物から調製される非ヒト哺乳動物細胞。
6. α -トコフェロール輸送タンパク質をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化可能であることを特徴とする非ヒト哺乳動物細胞。
7. α -トコフェロール輸送タンパク質をコードする内在性遺伝子の発現の抑制が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損によるものであることを特徴とする請求項6に記載の非ヒト哺乳動物細胞。
8. 非ヒト哺乳動物細胞が、げっ歯類に属する動物の細胞であることを特徴とする請求項6又は7に記載の非ヒト哺乳動物細胞。
9. げっ歯類に属する動物の細胞が、マウス細胞であることを特徴とする請求項8に記載の非ヒト哺乳動物細胞。
10. 細胞が、胚性幹細胞であることを特徴とする請求項5から9のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。
11. 請求項1から4のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、
(a) 請求項6から10に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入し、キメラ胚を作製する工程、および
(b) 該キメラ胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

1 2. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物又は請求項 5 から 10 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞を用いることを特徴とする医薬品のスクリーニング方法。

1 3. 請求項 1 2 に記載のスクリーニング方法によって得られる医薬品。

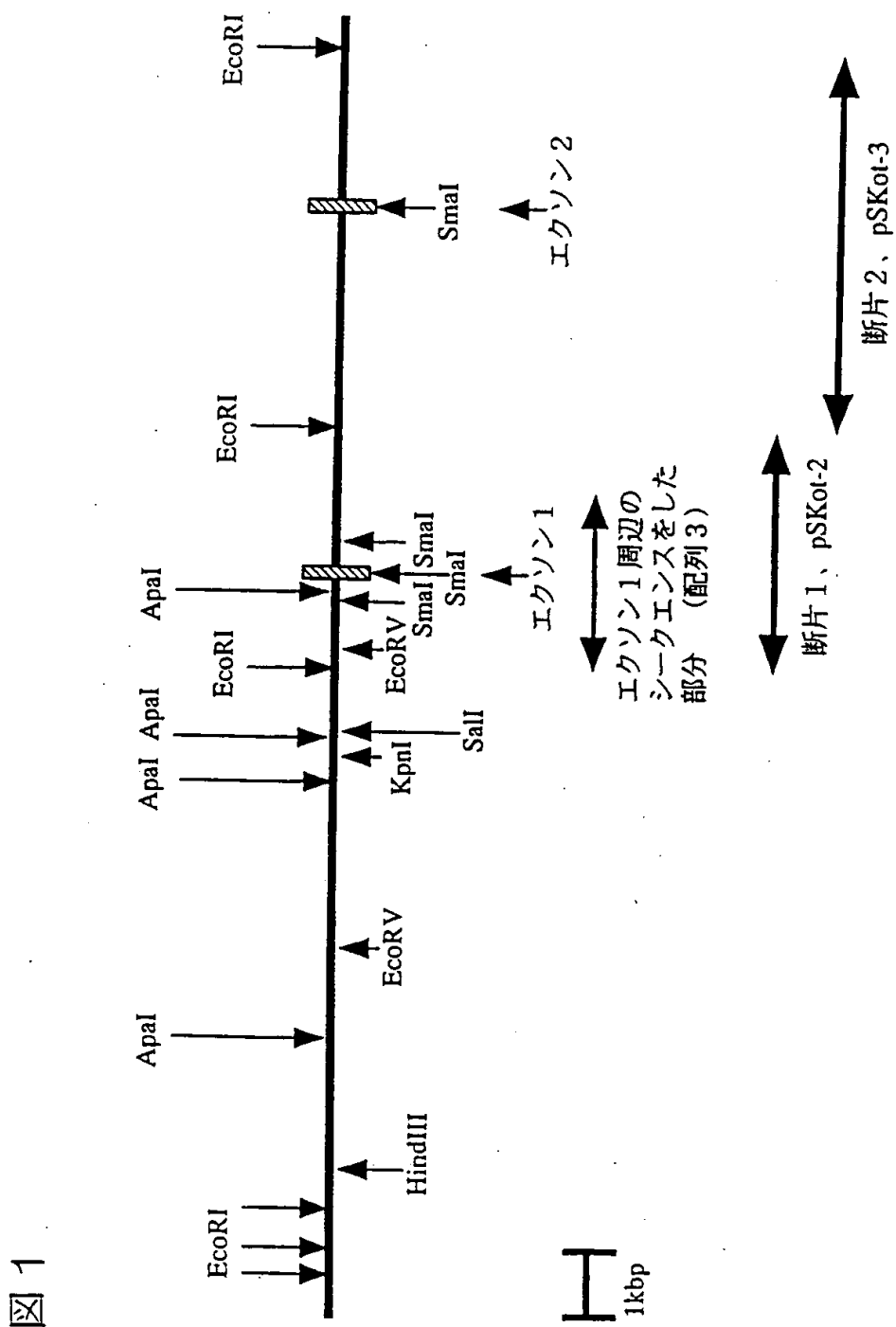


図 2

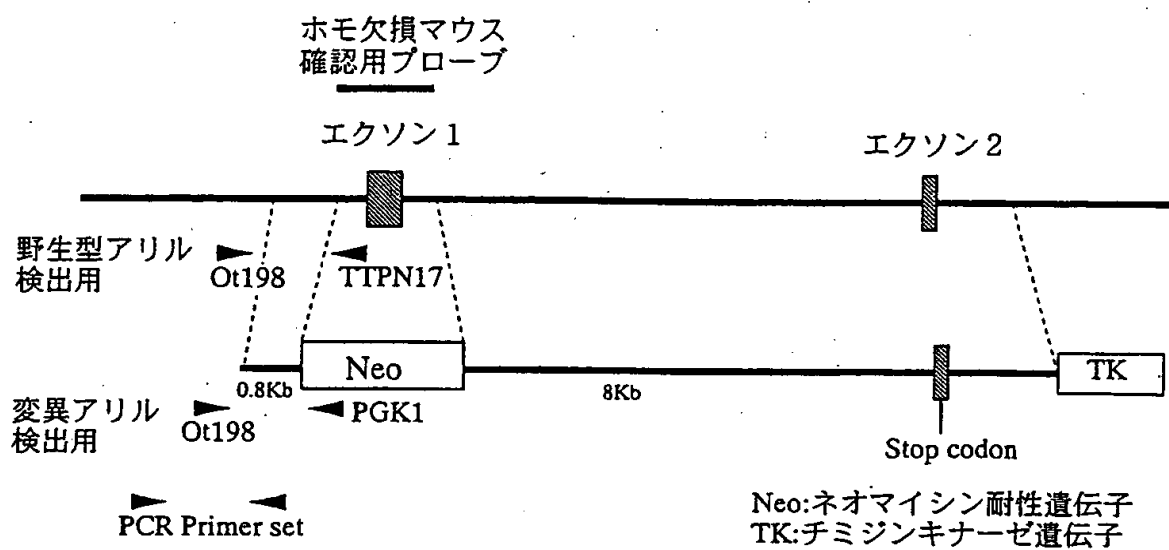


図 3

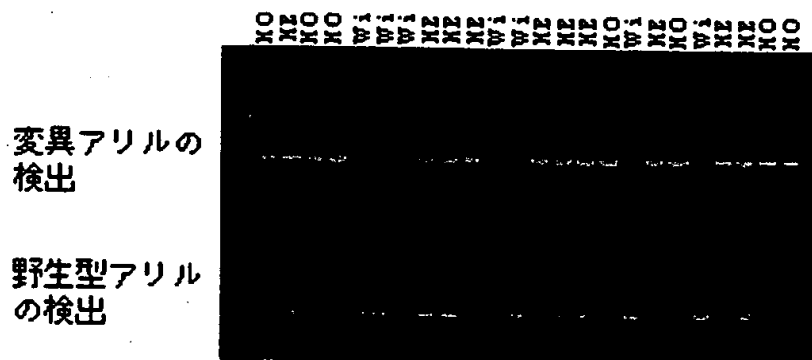


図 4-1

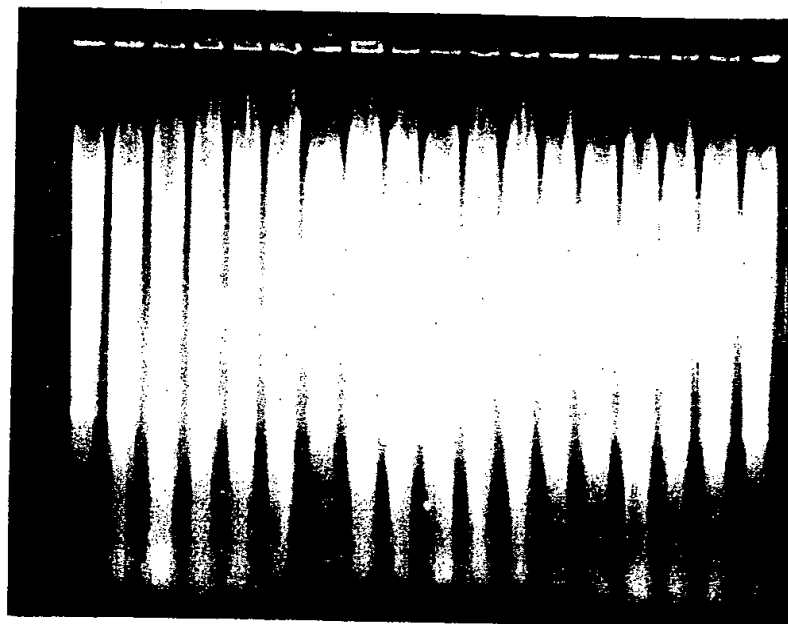


図 4-2

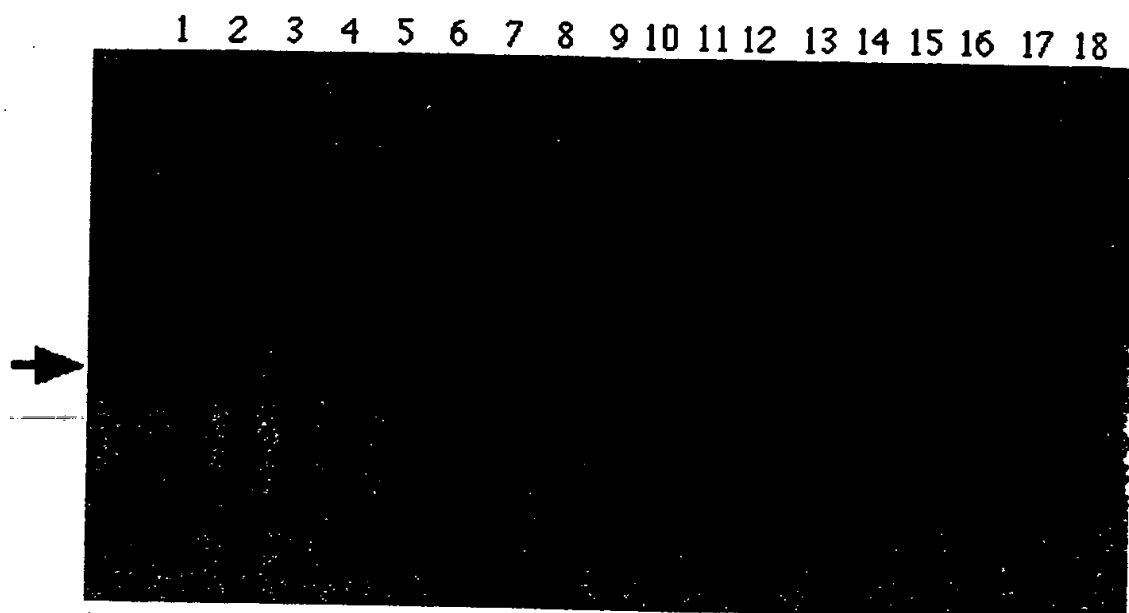


図 5-1

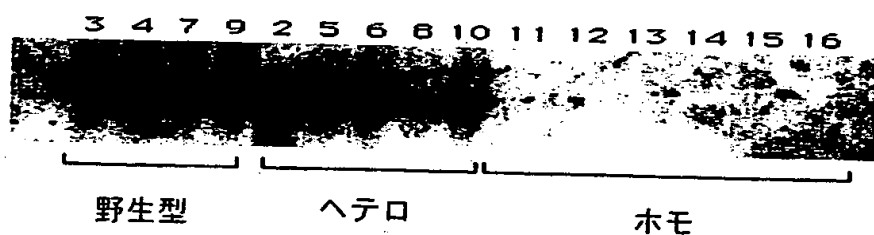


図 5-2

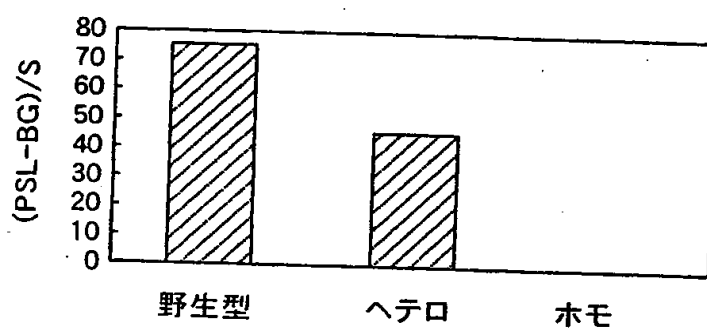


図 6

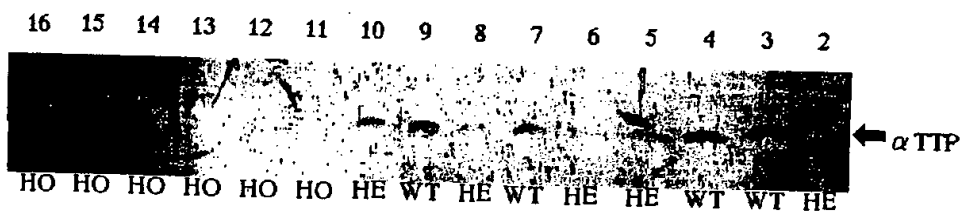
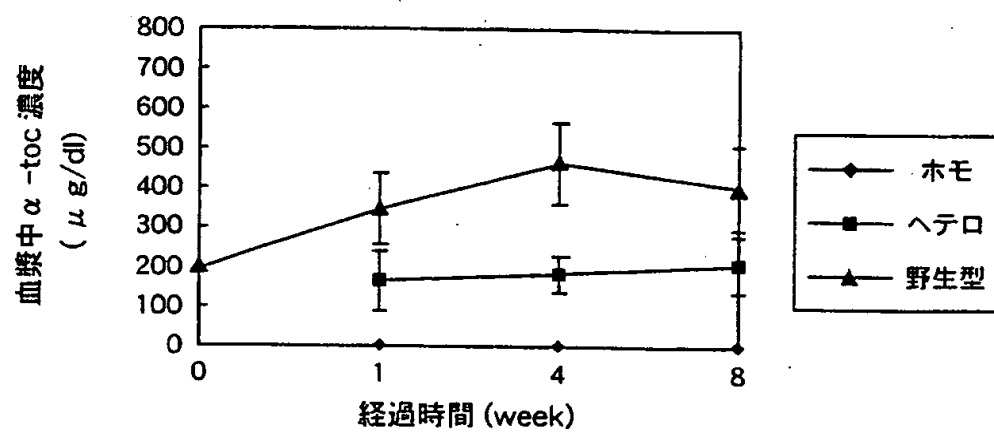


図 7



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Keizo Inoue
Hiroyuki Arai

<120> An animal with a knocked out α -tocopherol transfer protein gene

<130> PH-1014-PCT

<150> JP P1999-237003

<151> 1999-08-24

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 837

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (834)

<400> 1

atg gca gag atg cgg ccg ggg cca ttg gtt ggg aaa cag ctc aac gag 48
Met Ala Glu Met Arg Pro Gly Pro Leu Val Gly Lys Gln Leu Asn Glu

1	5	10	15	
ctg ccc gac cac tcg ccg ctg ctc cag ccc ggc ctg gcg gag ctc agg	96			
Leu Pro Asp His Ser Pro Leu Leu Gln Pro Gly Leu Ala Glu Leu Arg				
20	25	30		
cgc cgg gtg cag gag gca ggc gtc ccg cag acc ccg cag cct ctc aca	144			
Arg Arg Val Gln Glu Ala Gly Val Pro Gln Thr Pro Gln Pro Leu Thr				
35	40	45		
gac gct ttc ctg ctg cgc ttc ctg cgc gcc cgg gat ttc gat ctg gat	192			
Asp Ala Phe Leu Leu Arg Phe Leu Arg Ala Arg Asp Phe Asp Leu Asp				
50	55	60		
ctg gcc tgg cgc tta atg aaa aac tat tat aaa tgg cga gca gaa tgc	240			
Leu Ala Trp Arg Leu Met Lys Asn Tyr Tyr Lys Trp Arg Ala Glu Cys				
65	70	75	80	
cca gaa tta agt gca gat cta cgc cct aga agt atc ctt gga ctt ctg	288			
Pro Glu Leu Ser Ala Asp Leu Arg Pro Arg Ser Ile Leu Gly Leu Leu				
85	90	95		
aaa gct ggc tac cat ggc gtg ctc agg tcc cgg gat tct act ggc agt	336			
Lys Ala Gly Tyr His Gly Val Leu Arg Ser Arg Asp Ser Thr Gly Ser				
100	105	110		
aga gtt ctc att tac aga att gca tac tgg gac cca aaa gtt ttt aca	384			
Arg Val Leu Ile Tyr Arg Ile Ala Tyr Trp Asp Pro Lys Val Phe Thr				
115	120	125		
gct tat gat gta ttt cgt gta agt ctg atc aca tca gag ctc att gta	432			

Ala Tyr Asp Val Phe Arg Val Ser Leu Ile Thr Ser Glu Leu Ile Val	
130 135 140	
cag gag gtg gaa act caa cgc aat gga gtt aaa gct ata ttt gac ctg	480
Gln Glu Val Glu Thr Gln Arg Asn Gly Val Lys Ala Ile Phe Asp Leu	
145 150 155 160	
gaa ggc tgg cag gtt tct cat gct ttc caa att acc cca tct gta gcc	528
Glu Gly Trp Gln Val Ser His Ala Phe Gln Ile Thr Pro Ser Val Ala	
165 170 175	
aag aag att gct gct gla ctt aca gat tcc ttt cca ctg aaa gtt cgt	576
Lys Lys Ile Ala Ala Val Leu Thr Asp Ser Phe Pro Leu Lys Val Arg	
180 185 190	
ggg atc cat ttg ala aat gag cca gtc att ttc cat gct gtc ttc tcc	624
Gly Ile His Leu Ile Asn Glu Pro Val Ile Phe His Ala Val Phe Ser	
195 200 205	
atg att aaa cca ttt ctg act gaa aag att aag gac cgg att cat ctg	672
Met Ile Lys Pro Phe Leu Thr Glu Lys Ile Lys Asp Arg Ile His Leu	
210 215 220	
cac ggg aac aac tac aaa tca agc atg ctt cag cac ttc cca gac att	720
His Gly Asn Asn Tyr Lys Ser Ser Met Leu Gln His Phe Pro Asp Ile	
225 230 235 240	
ctt cct cgg gaa tat ggc ggt aaa gag ttc tcc atg gag gat att tgt	768
Leu Pro Arg Glu Tyr Gly Gly Lys Glu Phe Ser Met Glu Asp Ile Cys	
245 250 255	

cag gag tgg aca aat ttt ata atg aag tct gaa gal tat ctc agc agc 816
 Gln Glu Trp Thr Asn Phe Ile Met Lys Ser Glu Asp Tyr Leu Ser Ser
 260 265 270

att tct gag acc atc caa tga 837
 Ile Ser Glu Thr Ile Gln
 275

<210> 2

<211> 278

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Glu Met Arg Pro Gly Pro Leu Val Gly Lys Gln Leu Asn Glu
 1 5 10 15

Leu Pro Asp His Ser Pro Leu Leu Gln Pro Gly Leu Ala Glu Leu Arg
 20 25 30

Arg Arg Val Gln Glu Ala Gly Val Pro Gln Thr Pro Gln Pro Leu Thr
 35 40 45

Asp Ala Phe Leu Leu Arg Phe Leu Arg Ala Arg Asp Phe Asp Leu Asp
 50 55 60

Leu Ala Trp Arg Leu Met Lys Asn Tyr Tyr Lys Trp Arg Ala Glu Cys
 65 70 75 80

Pro Glu Leu Ser Ala Asp Leu Arg Pro Arg Ser Ile Leu Gly Leu Leu

85	90	95
Lys Ala Gly Tyr His Gly Val Leu Arg Ser Arg Asp Ser Thr Gly Ser		
100	105	110
Arg Val Leu Ile Tyr Arg Ile Ala Tyr Trp Asp Pro Lys Val Phe Thr		
115	120	125
Ala Tyr Asp Val Phe Arg Val Ser Leu Ile Thr Ser Glu Leu Ile Val		
130	135	140
Gln Glu Val Glu Thr Gln Arg Asn Gly Val Lys Ala Ile Phe Asp Leu		
145	150	155
		160
Glu Gly Trp Gln Val Ser His Ala Phe Gln Ile Thr Pro Ser Val Ala		
165	170	175
Lys Lys Ile Ala Ala Val Leu Thr Asp Ser Phe Pro Leu Lys Val Arg		
180	185	190
Gly Ile His Leu Ile Asn Glu Pro Val Ile Phe His Ala Val Phe Ser		
195	200	205
Met Ile Lys Pro Phe Leu Thr Glu Lys Ile Lys Asp Arg Ile His Leu		
210	215	220
His Gly Asn Asn Tyr Lys Ser Ser Met Leu Gln His Phe Pro Asp Ile		
225	230	235
		240
Leu Pro Arg Glu Tyr Gly Gly Lys Glu Phe Ser Met Glu Asp Ile Cys		
245	250	255

Gln Glu Trp Thr Asn Phe Ile Met Lys Ser Glu Asp Tyr Leu Ser Ser
 260 265 270

Ile Ser Glu Thr Ile Gln
 275

<210> 3

<211> 2748

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1139).. (1342)

<400> 3

gaattcaaag cttcagccc ggtaaccaag caccacagcc agctctcttt gtagttcagg 60

ggttcacacc acaacacagc cgcttggcct tgttccctgg tgtttgctta atgttctcct 120

acaccaigga ggagatttac cttgtctcct ttactttcca gccacacaa aaatgaaaaa 180

cgcttccaag gcaagagttc tgttttgagg atatcttcaa taatcggaac atggtctcta 240

cccaagagcc atccatcag acattcttgc tctgagttcc tttaaggcct ctttactctg 300

caaaatcagt gtttttgtaa catgcactgc atattaagag gagttagttt tgtggacttt 360

cttctgttca ggtggcagtt caagtgtagg ataattttaa tggaaatgaa ggaaaaatac 420

ttccgtgtgt tcattcagat ttccgggtca tctctgtgta ttcttcagca gacatccttc 480
 aggttcctta agtaagggtt ttgattgaga gactgggtgc atctaaacac atacatcggt 540
 agtgillaaa aatgtgacct cccccaccg cctccttctc tctagtagag ccagatgcc 600
 agatctggaa gcattttcct ggagagaagc aaggaggagg aggaggagac tgccaaaagg 660
 tgacttcctt gagttacat ttggaaacta gttagaatgc cagagatggc ctgagctcag 720
 ccttaaggaa ggggtcagga ggagggtcc tgagtgtctg ctaccaagc taattaaaga 780
 gccgtttaca gtgttccctg attccaaaac ggacagaggg ggaagggcaa cgaggaaagg 840
 gtgagaaaag tctctggcag cctgattata aacatcccaa gtaacttttc gacttccgt 900
 tctttagggt caacactagt gactttccct tccccggga ctggctgcgg ttaccttggt 960
 gagcaccgga gggcaccacg tgggttctt taagaggcg ccgtgacct tgcaccggcg 1020
 gggcacggga gatcggggcg gcccggtga gtgtgcgtgg ggcggcgtcc acggcgggg 1080
 gcggagggtg gctctgggcc cgcactttc cccctgtcgc cgggacagca cggcgggc 1138
 atg gca gag atg cgg ccg ggg cca ttg gtt ggg aaa cag ctc aac gag 1186
 Met Ala Glu Met Arg Pro Gly Pro Leu Val Gly Lys Gln Leu Asn Glu
 1 5 10 15
 ctg ccc gac cac tgg ccg ctg ctc cag ccc ggc ctg gct gag ctc agg 1234
 Leu Pro Asp His Ser Pro Leu Leu Gln Pro Gly Leu Ala Glu Leu Arg

20	25	30	
cgc cgg gtg cag gag gca ggc gtc cgg cag acc cgg cag cct ctc aca			1282
Arg Arg Val Gln Glu Ala Gly Val Pro Gln Thr Pro Gln Pro Leu Thr			
35	40	45	
gac gct ttc ctg ctg cgc ttc ctg cgc gcc cgg gat ttc gat ctg gat			1330
Asp Ala Phe Leu Leu Arg Phe Leu Arg Ala Arg Asp Phe Asp Leu Asp			
50	55	60	
ctg gcc tgg cgc glaagtgtc accgggggcg ggcagagctc ggcgacggcg			1382
Leu Ala Trp Arg			
65			
gaatccacgc gcgccgagcg tggcagtgctg actgcaggcg cgcccagaac cccgatttcg			1442
ccccgccga tgttttggtc cccgccgccc cgaggacatc ccgtggacta ctagggtcct			1502
tgggaattaa acaaagtgga gatccctgtc ccccggggtg ctgagctgtg tlaactgaat			1562
agataactag gtgtggacag aggacgacga aatggacatc taaaggcatc ttgaaaaaga			1622
ctatgttaat agagctaaat gcacagtttg gcaigtittga maccagggc agtacagatg			1682
atttcittta tgtttcaggt attcacaaca cactggcctt ggggcaagag agatggggcc			1742
ttagggtcag ggagatgcga ccttgacitt gtccctcttg ggtcagcac ccttatctgt			1802
tcagtaactg ttaggacatg acagtagitt cgagaattgc acattaacct ggaatgctag			1862
aacaagalgt gccaaacct gtgcttggca cggagaaagt agtcagtga cagcaggctg			1922

cggaattcca acatgccctg ggtilatgaa acttttttta ttggalaagc accaagiatg 1982
gcaaaaaaca ccacaaaca taaaaacag gaaaaacdtc aaaggaattt cctaaaagaa 2042
aagaatttcc caacacaaac tctagttaga ccttggaggac ccagaagtat ggcattacct 2102
gttacgtcaa gccgtgttaa caatgtcacg caaacatgcg ctgtgagttt atttttcctt 2162
tgcaaatctc aactgcatgc tgttatagaa tcaggtcatg tgaacatgtg ctacacaccta 2222
ctactctttt gggaataatc agtcagttt ttgtttgttg ctgtlagagat tgttaccggg 2282
cgggtgctgt taggccctat gctgatcgtt catccctaca ttcatgtatg ggggaccag 2342
cgctgccatg ttactgttc atctcttcac ttcatltgga gtttctcctt ctttttcttt 2402
ctttttcttt tcttttcttt ttaataacca cacactgcct agcagtatac aaatgccatc 2462
aacaggtgag tattttcttc tctccctgac tgcataaag ttggtctttg tctgtacaca 2522
taaattggaa catacctta ttgaacaaat ccatcagttg ctgaagcacg acgcagacat 2582
gtttactgtt gaggagcgca ccaccttgc agggagtitt cagtgtttgc tactctgatg 2642
aaatgcacac tgcatagtga cgtcttttct tctctatgt tatgtacact gtcttaccaa 2702
atrggatgia tgccgtctag atgaggatag ttttgcattt cattat 2748

<211> 68

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Glu Met Arg Pro Gly Pro Leu Val Gly Lys Gln Leu Asn Glu
1 5 10 15

Leu Pro Asp His Ser Pro Leu Leu Gln Pro Gly Leu Ala Glu Leu Arg
20 25 30

Arg Arg Val Gln Glu Ala Gly Val Pro Gln Thr Pro Gln Pro Leu Thr
35 40 45

Asp Ala Phe Leu Leu Arg Phe Leu Arg Ala Arg Asp Phe Asp Leu Asp
50 55 60

Leu Ala Trp Arg
65

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gctaaagcgc atgctccaga ctgccttg

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

agcccacaca aaaatgaaaa acgtctccaa g

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

tctctgcaat gcccgccgtg ctgtcccg

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

aggaattcat ggcagagatg cg

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

agggcgtaga tctgcactta at

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A01K67/027, C12N15/12, C12N5/06, C12N5/16,
A61K45/00, A61P3/02, A61P9/10, A61P3/10
G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A01K67/027, C12N15/12, C12N5/06, C12N5/16,
A61K45/00, A61P3/02, A61P9/10, A61P3/10
G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG (BIOSIS)
JOIS (JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol.268, No.24, 17705-17710, (1993)	1-12
Y	Biochemistry Journal, Vol.306, No.2, 437-443, (1995)	1-12
Y	Nature Genetics, Vol.9, No.2, 141-145, (1995)	1-12
Y	Nature, Vol.336, 348-352, (1988)	1-12
P,X P,Y	Circulation, Vol.100, No.18, Supp. [S], 231-231, (02.11.99)	1,3-6,8-12 2,7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 November, 2000 (21.11.00)

Date of mailing of the international search report
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05686

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 13
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

It is merely a medicine which is specified exclusively by a screening method. Thus, it is not sufficiently disclosed what substance the medicine is in detail. Namely, this medicine is not sufficiently supported by the description.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/05686

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A01K67/027, C12N15/12, C12N5/06, C12N5/16,
A61K45/00, A61P3/02, A61P9/10, A61P3/10
G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A01K67/027, C12N15/12, C12N5/06, C12N5/16,
A61K45/00, A61P3/02, A61P9/10, A61P3/10
G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2000年
日本国登録実用新案公報 1994-2000年
日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DIALOG (BIOSIS)
JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol.268, No.24, 17705-17710, (1993)	1-12
Y	Biochemistry Journal, Vol.306, No.2, 437-443, (1995)	1-12
Y	Nature Genetics, Vol.9, No.2, 141-145, (1995)	1-12
Y	Nature, Vol.336, 348-352, (1988)	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.11.00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

印

2B

2914

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	Circulation, Vol.100, No.18, Supp. [S], 231-231, (02.11.99)	1, 3-6, 8-12 2, 7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 00/05686

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 13 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
スクリーニング方法のみで特定された薬剤であるので、具体的にどのような物質であるのか十分に開示されておらず、明細書による十分な裏付けを欠いている。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。